



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado

## ANÁLISIS DE MICOTOXINAS EN CEREALES MEDIANTE TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Autor/es

Victoria Lamenca Palacio

Director/es

Marta Herrera Sánchez

Agustín Ariño Moneva

Facultad de Veterinaria

2015

---



## **Agradecimientos**

El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido financiado con el Contrato OTRI 2014/0537 CEBALIMENT, así como con el Grupo de Investigación Consolidado A01 “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” del Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo. Esta investigación se enmarca en las actividades de la Red de Excelencia MICOFOOD (AGL2014-52648-REDT).



1	ÍNDICE	
2	RESUMEN.....	1
3	ABSTRACT .....	2
4	OBJETIVOS.....	3
5	INTRODUCCION .....	4
5.1	Micotoxinas .....	4
5.2	Deoxinivalenol (DON) .....	5
5.3	Toxicidad de deoxinivalenol.....	7
5.4	Normativa legal.....	7
5.5	La cebada y el deoxinivalenol .....	9
5.6	Técnicas de análisis de deoxinivalenol .....	10
6	MATERIALES Y METODOS .....	13
6.1	Recogida y preparación de las muestras .....	13
6.2	Reactivos y preparación de disoluciones de trabajo .....	14
6.3	Equipos y material fungible .....	15
6.4	Técnica analítica para la detección y cuantificación de deoxinivalenol en cebada y forraje de cebada .....	16
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
7.1	Tasas de deoxinivalenol en granos de cebada y forraje de cebada .....	20
7.2	Efecto del clima y las prácticas agrícolas en la contaminación por DON .....	22
8	CONCLUSIONES .....	24
9	CONCLUSIONS .....	24
10	APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE.....	25
11	EVALUACIÓN DE LA ASIGNATURA Y SUGERENCIAS DE MEJORA .....	25
12	BIBLIOGRAFÍA.....	26



## 2 RESUMEN

Las micotoxinas son compuestos químicos producidos naturalmente por el metabolismo secundario de especies de hongos filamentosos que pertenecen generalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

Debido a sus efectos sobre la salud humana y animal y las importantes pérdidas económicas que provocan sus efectos, la contaminación de alimentos y piensos con micotoxinas es un problema relevante a nivel mundial.

Los granos de cereales pueden sufrir una contaminación fúngica a nivel de campo por mohos del género *Fusarium*, alguna de cuyas especies sintetiza micotoxinas como deoxinivalenol (DON) si se presentan condiciones ambientales favorables, así como si se llevan a cabo unas inadecuadas prácticas agrícolas en los cultivos.

El presente estudio consistió en evaluar las tasas de contaminación por deoxinivalenol en 34 muestras de cebada en grano y forraje procedentes de las Comunidades Autónomas de Aragón y Cataluña. Las muestras se analizaron mediante un método analítico optimizado y validado en nuestro laboratorio basado en la norma UNE-EN 15891:2011 y en protocolos de fabricantes de material para análisis de micotoxinas (VICAM, 2013). El método consistió en una etapa de extracción del analito de la matriz, purificación del extracto con columnas de inmunoafinidad y determinación de las tasas de contaminación por DON en los granos de cebada y forrajes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de red de diodos.

El porcentaje de positividad a DON en las muestras de granos de cebada (n=30) fue del 26,7%, mientras que las 4 muestras de forraje de cebada resultaron estar contaminadas con deoxinivalenol.

Los resultados obtenidos indican una contaminación media de deoxinivalenol en granos de cebada de 230 µg/kg, con unas tasas de contaminación comprendidas entre 110 y 500 µg/kg. En el caso de las muestras de forraje de cebada, la contaminación media (620 µg/kg) fue superior a la analizada en los granos, pero ambas matrices no superaron en ningún caso los criterios establecidos por la legislación.

### 3 ABSTRACT

Mycotoxins are chemical compounds naturally produced by the secondary metabolism of species of filamentous fungi which generally belong to the genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*.

Because of its effects on human and animal health and the important economic losses caused for its effects, contamination of food and feed with mycotoxins is a significant problem worldwide.

The cereal grains may suffer a fungal contamination in the field by *Fusarium* molds, some of which species synthesize mycotoxins such as deoxynivalenol (DON) if favorable environmental conditions exist and if some inadequate agricultural practices are carried out.

The present study evaluated the contamination with deoxynivalenol in 34 samples of barley grain and fodder from Aragon and Catalonia. Samples were analyzed by an analytical method optimized and validated in our laboratory based on the standard UNE-EN 15891: 2011 along with protocols by suppliers of material for mycotoxin analysis (VICAM, 2013). The method consisted of a extraction of the analyte from the matrix, purification of the extract with immunoaffinity columns and determination of DON concentrations in barley grains and fodder by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a diode array detector.

The percentage of positive samples for DON in grain barley samples (n=30) was 26.7%, while all four feed barley samples were found to be contaminated with deoxynivalenol.

The results show an average contamination of deoxynivalenol in barley grains 230 µg/kg, with rates of contamination ranging between 110 and 500 µg/kg. In the case of samples of fodder barley, the average contamination (620 µg/kg) was higher than in the analyzed grains, but both matrices did not exceed in any case the limits established by the legislation.



#### 4 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es aprender las técnicas y la metodología necesaria para la detección de la micotoxina deoxinivalenol en cebada.

Para conseguir el objetivo principal es necesario:

- Conocer la importancia de la detección de deoxinivalenol en cebada, su incidencia, consecuencias toxicológicas y los protocolos de actuación ante su presencia.
- Adquirir competencias sobre el uso de equipos y técnicas de laboratorio necesarias para la detección de deoxinivalenol en cebada.
- Analizar e interpretar los resultados y conclusiones obtenidas tras el trabajo de laboratorio.
- Conocer las medidas de seguridad personal y calidad analítica a la hora de trabajar en el laboratorio de análisis de contaminantes en alimentos.

Tras la realización de las tareas mencionadas, se dispondrá de información suficiente para evaluar si las muestras de cebada analizadas han sido cultivadas y/o almacenadas en las condiciones óptimas para prevenir o reducir la presencia de deoxinivalenol.

## 5 INTRODUCCION

### 5.1 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son compuestos químicos producidos naturalmente por el metabolismo secundario de especies de hongos filamentosos que pertenecen generalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Son capaces de crecer sobre las materias primas y alimentos en condiciones favorables de crecimiento, como la elevada actividad de agua y temperatura, afectando principalmente a los cereales (Ramos, 2011).

La contaminación de alimentos y piensos con micotoxinas es un problema relevante a nivel mundial, debido a sus efectos sobre la salud humana y animal y las importantes pérdidas económicas que provocan sobre la productividad agroganadera así como el impacto sobre el comercio nacional e internacional.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que el 25% de los cultivos de alimentos a nivel mundial, incluyendo los alimentos básicos para la salud como los cereales, están contaminados por hongos productores de micotoxinas (Köppen et al, 2010).

Estos metabolitos no sólo pueden formarse en el cultivo de las materias primas en el campo sino que también pueden aparecer durante la recolección, transporte y almacenamiento. Además, por ser termoestables, persisten durante el proceso de elaboración de los productos alimenticios.

Las micotoxinas pueden entrar en la cadena alimentaria de forma directa a través del consumo de alimentos como los cereales, frutos secos, vino y café entre otros, o de una forma indirecta a través de la carne, leche u otros productos de origen animal como resultado de la ingestión por parte de los animales de piensos contaminados con estas toxinas (Ramos, 2011).

Estos tóxicos se producen frecuentemente en zonas con clima cálido y húmedo que favorecen el crecimiento fúngico, aunque también pueden proliferar en climas más templados.

Las enfermedades causadas por estos agentes contaminantes se denominan micotoxicosis. En la actualidad, desde el punto de vista de la salud pública, es más probable la toxicidad crónica debida a la exposición continuada a bajas concentraciones

de micotoxinas a través del consumo de distintos alimentos. La toxicidad de estos metabolitos afecta a los sistemas inmunológico, hematológico, hepático, renal, neurológico y respiratorio, así como también pueden producir reacciones dermatológicas y provocar efectos mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos y estrogénicos (Speijers y Speijers, 2004).

## 5.2 DEOXINIVALENOL (DON)

El DON o vomitoxina es uno de los tricotecenos más relevantes por sus efectos sobre la salud humana y animal. Esta micotoxina, producida principalmente por mohos del género *Fusarium*, se ha clasificado como el tricoteceno de Tipo B más fitotóxico.

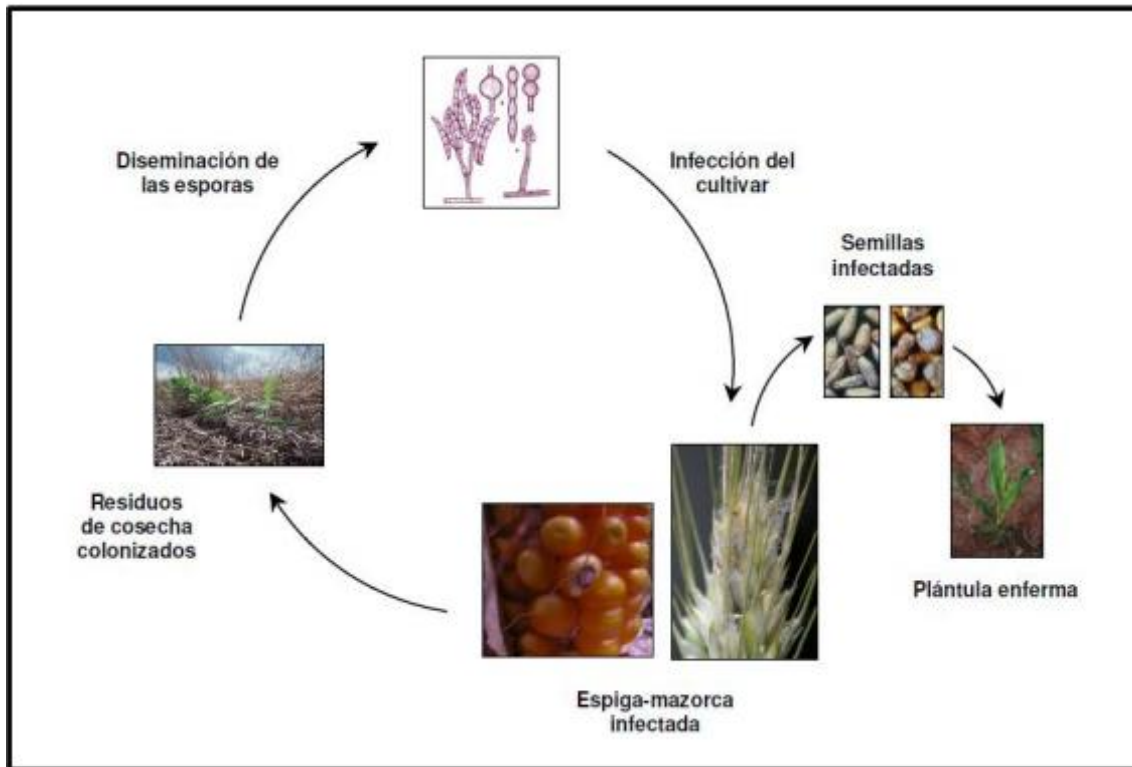
La infección de la espiga se produce tras la contaminación con *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) y *Fusarium culmorum* que proliferan y producen micotoxinas en las cosechas de cereales. Además de dichas especies de *Fusarium*, otros mohos como *Trichoderma* y *Cylindrocarpon* pueden también sintetizar DON, aunque en menores cantidades (Bottalico y Perrone, 2002).

Una de las principales enfermedades asociadas a la infección con mohos productores de DON es la fusariosis de la espiga o espiga blanca (*Fusarium head blight*, FHB) (Eudes et al. 2001). Esta enfermedad fúngica puede afectar a varios cereales, incluyendo la cebada, y suele producirse durante la floración. La fusariosis produce un gran impacto económico generando pérdidas de producción y económicas pero, además, esta enfermedad tiene mucha importancia porque los cereales que la padecen están contaminados con más de un tipo de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*.

El deoxinivalenol y sus derivados son las toxinas de *Fusarium* más prevalentes en la cebada y presentan una alta incidencia en la mayoría de los cereales (JECFA, 2011).

Se han identificado factores de riesgo de tipo ambiental y agronómico en relación con la presencia de deoxinivalenol que pueden ser controlados. Sin embargo, existen otros muchos como por ejemplo el clima y la variabilidad de las cepas productoras que son muy difíciles de controlar (Zain, 2011).

El ciclo infectivo de *Fusarium* en cereales se señala en la Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo infeccioso de *Fusarium* (Jurado, 2006)

La principal fuente de contaminación de *Fusarium* en los cereales, procede de residuos de cosechas anteriores de cultivos hospedadores de este moho, como el trigo, maíz y cebada (Xu, 2003).

Existen factores agronómicos que reducen la infección de *Fusarium* como por ejemplo el laboreo profundo y la rotación de cultivos. Es importante incorporar en la planificación de los cultivos de cebada las rotaciones con cultivos no hospedadores de *Fusarium* toxigénicos, como girasol y guisantes.

En muchos estudios se ha correlacionado la presencia de DON y mohos del género *Fusarium* en el campo con la persistencia de residuos de cosechas anteriores no retiradas (Maiorano et al. 2008). Estos mohos sobreviven más tiempo en los residuos depositados en la superficie del suelo que en los residuos enterrados (Khongsa y Sutton 1988; Pereyra et al 2004; Pereyra y Dill Macky 2008). En este sentido se ha comprobado que las ascosporas de *Gibberella zeae* (teleomorfo de *F. graminearum*) son capaces de inducir la enfermedad en cultivos de cebada tras persistir dos años en los residuos de trigo que se han dejado en el campo (Pereyra et al. 2004).

Los climas templados favorecen la producción de deoxinivalenol en los cultivos y puede considerarse que las temperaturas frías son más seguras. La información sobre la

influencia de la humedad y las lluvias es contradictoria, pero generalmente, las precipitaciones durante periodos críticos como el espigado y la floración tienen un impacto importante en el desarrollo de la fusariosis y contaminación por DON en los cereales (Hooker et al. 2002).

El porcentaje de humedad óptimo de los granos de cereal para la producción de DON por *F. culmorum* y *F. graminearum* es de al menos un 15% en combinación con una temperatura entre 15 y 25°C (Gilbert y Tekauz, 2000).

### 5.3 TOXICIDAD DE DON

Los síntomas agudos que produce el DON son principalmente diarreas, vómitos y hemorragias. La toxicidad tras la ingestión de dosis bajas (crónica) a través de los alimentos se caracteriza por la disminución del apetito llegando incluso a producir anorexia, reducción de la ganancia de peso, disminución de la eficiencia nutricional, cambios neuroendocrinos y efectos perjudiciales sobre el sistema inmunológico (Rotter et al, 1996; Larsen et al, 2004).

El DON no parece ser carcinogénico en animales de experimentación ni para el hombre ya que ha sido clasificado como perteneciente al grupo 3 por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC 1993).

### 5.4 NORMATIVA LEGAL

Debido a que el deoxinivalenol y otras micotoxinas causan efectos adversos sobre la salud humana y animal, las autoridades sanitarias han establecido reglamentaciones que fijan límites máximos de contaminación por micotoxinas en los alimentos.

En alimentación humana, el Reglamento CE N° 1881/2006 (Comisión Europea, 2006a) fija el contenido máximo de determinados contaminantes en productos alimenticios, entre ellos se encuentra el DON cuyos niveles máximos se detallan en la (Véase Tabla 1).

**Tabla 1.** Contenidos máximos de DON en los productos alimenticios (Reglamento CE N° 1881/2006)

Productos alimenticios		Contenido máximo (µg/kg)
<b>2.4</b>	<b>Deoxinivalenol</b>	
<b>2.4.1</b>	Cereales no elaborados que no sean de trigo duro, avena y maíz	1250
<b>2.4.2</b>	Trigo duro y avena no elaborados	1750
<b>2.4.3</b>	Maíz no elaborado	1750
<b>2.4.4</b>	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales (incluida la harina de maíz, y el maíz triturado y molido), salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen, a excepción de los productos enumerados en el punto 2.4.7.	750
<b>2.4.5</b>	Pasta (seca)	750
<b>2.4.6</b>	Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno	500
<b>2.4.7</b>	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	200
<b>2.4.8.</b>	Fracciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula > 500 micras, no destinadas al consumo humano directo	750
<b>2.4.9.</b>	Fracciones de la molienda del maíz con un tamaño de partícula ≤ 500 micras, no destinadas al consumo humano directo	1250

La cebada en grano se incluiría dentro del apartado 2.4.1. que determina el contenido máximo de deoxinivalenol en cereales no elaborados que no sean el trigo duro, avena y maíz en 1250 µg/Kg.

En cuanto a la alimentación animal, la Recomendación 576/2006/CE (Comisión Europea, 2006b) establece los contenidos máximos sobre la presencia de deoxinivalenol en productos destinados a la alimentación animal en 8000 µg/Kg (Véase Tabla 2).

**Tabla 2.** Valores orientativos recomendados de DON en alimentación animal en la Unión Europea

Micotoxina	Producto	Valor recomendado (mg/kg)
Deoxinivalenol (DON)	Materias primas para piensos	
	- Cereales y productos a base de cereales, con excepción de los subproductos de maíz	8
	- Subproductos de maíz	12
	Piensos complementarios y complementos, con excepción de:	5
	- Piensos complementarios y completos para cerdos	0,9
	- Piensos complementarios y completos para terneros (menos de 4 meses), corderos y cabritos.	2

### 5.5 LA CEBADA Y EL DON

El trigo, la cebada y el maíz representan en conjunto dos terceras partes de la producción mundial de cereales y son los cultivos más susceptibles a la enfermedad causada por *Fusarium* y a la contaminación por DON (Abramson, 1998).

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) está considerada como uno de los cereales más importantes a nivel mundial. La cebada es un cereal que puede utilizarse tanto en alimentación humana (cereales tostados, pan, cerveza) como animal (grano o forraje). Actualmente la mayor parte de la producción de cebada se destina a piensos de alimentación animal, y la de mejor calidad se utiliza para la producción de malta, cerveza y whisky (Bolechová et al. 2015). Los granos de cebada contaminados con altos niveles de DON suponen pérdidas económicas tanto para los productores artesanales de cerveza como para las industrias cerveceras.

Unos estudios previos demostraron que el DON y sus derivados acetilados, se producen y permanecen localizados en las partes externas de los granos de cebada a niveles bajos de contaminación (Schollenberger et al, 2002). Sin embargo, a niveles más elevados de contaminación, las toxinas pueden distribuirse de forma más uniforme en todo el grano (Scott et al, 1984).

En la literatura científica existen varios trabajos sobre la incidencia y tasas de contaminación con DON en la cebada. En España, Ibáñez-Vea et al. (2012) analizaron 123 muestras de cebada procedentes de Navarra, detectando DON en el 95% de las muestras con un valor medio de 57 µg/kg y un máximo de 1111 µg/kg. Las lluvias y el calor durante la floración tuvieron una gran influencia en los niveles de DON.

Durante los años 2002 a 2005 en el Reino Unido, se detectó la presencia de DON en el 57% de las 446 muestras de cebada analizadas, sólo una de ellas (0,2% del total) superó el límite legal para el DON en cebada sin procesar fijado en 1250 µg/kg. En general, el riesgo de superar los límites legales fijados para las micotoxinas de *Fusarium* en los cereales destinados a la alimentación humana en el Reino Unido es muy bajo, pero el porcentaje de muestras positivas varía cada año (Edwards, 2009).

Entre 1993 y 2003, en los Estados Unidos, se tomaron y analizaron 2106 muestras de cebada para detectar la presencia de DON (Schwarz et al., 2006). El 38,4% presentó niveles de DON inferiores a 500 µg/kg; el 14,5 % presentó niveles de 500 a 1000 µg/kg; el 28,5 % contenía de 1000 a 3000 µg/kg y el 18,6% contenía más de 3000 µg/kg. Casi el 50% de las muestras analizadas superaron los límites máximos establecidos por la legislación europea (1250 µg/kg).

Durante la cosecha del año 2012 fueron analizados tres lotes de muestras de cebada (52 muestras en total) en la República Checa (Bolechová et al, 2015). Las concentraciones de DON analizadas por el método ELISA se encontraban en un intervalo de 255 µg/kg hasta 917 µg/kg, y las obtenidas por HPLC-MS/MS desde 69,9 µg/kg hasta 602,3 µg/kg. Ninguna de las muestras positivas superaba los límites máximos exigidos.

## 5.6 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DON

En la actualidad existen métodos normalizados para el análisis de micotoxinas por parte del Comité Europeo de Normalización (CEN), que es un equivalente europeo a la Organización Internacional de Normalización (ISO).



Concretamente para la determinación de deoxinivalenol existen métodos normalizados para el análisis en cereales y derivados:

La Norma UNE-EN 15891: 2011 describe un método para la determinación de DON en cereales (en grano y harina): “Productos alimenticios. Determinación de deoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método HPLC con purificación de columna de inmunoafinidad y detección por ultravioleta (UV)”.

Los métodos analíticos disponibles que se describen en la literatura científica para la determinación de DON se basan principalmente en los principios de inmunoensayo, cromatografía, y espectrometría de masas, con los que se obtienen resultados tanto cualitativos como cuantitativos (Ran et al. 2013). Los métodos tradicionalmente más utilizados incluyen la cromatografía de gases (GC), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los cuales implican preparación de la muestra, largos tiempos de análisis y conocimientos técnicos (Tacke et al. 1996; Trucksess et al. 1998; Klotzel et al. 2005). También son utilizados otros métodos de análisis rápidos, sencillos y de bajo coste, que permiten obtener de modo semicuantitativo la presencia o ausencia de los niveles máximos legislados de DON en diversos tipos de alimentos (métodos de cribado o screening) (Meneely et al. 2011). El método de referencia según la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para la determinación de DON es la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta (HPLC/ DAD) ya que el DON carece de propiedades fluorescentes (MacDonald et al. 2005), y por ser un método robusto y exacto.

Para la preparación de las muestras se debe considerar las características del DON y de la matriz con la que se trabaja. En cada caso es necesaria la optimización del disolvente de extracción y de las técnicas físicas utilizadas en esta etapa (agitadores o mezcladores) para producir una extracción eficiente y completa de la micotoxina de la matriz. En la etapa de purificación se utilizan generalmente columnas de inmunoafinidad (IAC) que incluyen anticuerpos selectivos anti-DON para su separación del resto de compuestos del extracto, consiguiendo, además de la purificación, su preconcentración. También se utilizan frecuentemente columnas de extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) consistentes en una fase estacionaria adsorbente de partículas gruesas donde

el DON se retiene a la vez que se eluyen los componentes de la matriz, y donde también puede realizarse su preconcentración (Klinglmayr et al. 2010; Cunha y Fernandes, 2012).

La determinación por HPLC de DON generalmente se lleva a cabo con detectores UV-Visible por las propias características de la micotoxina que es capaz de absorber a 220 nm por los anillos aromáticos de su estructura (Klotzel et al. 2005; Muscarella et al. 2012).

## 6 MATERIAL Y METODOS

### 6.1 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El presente estudio consistió en evaluar las tasas de contaminación por deoxinivalenol en muestras de cebada procedentes de las Comunidades Autónomas de Aragón y Cataluña, de la cosecha de 2014.

Se han analizado un total de 34 muestras de cebada, de las cuales 30 correspondían a granos de cebada y 4 a forrajes de cebada (tallos y restos procedentes de residuos de cosecha). En Sariñena pudieron tomarse muestras emparejadas de residuos de la cosecha anterior (forraje) y grano de cebada de la cosecha 2014.

En la Tabla 3 se describe el tipo de muestra, el número, la codificación y la procedencia.

**Tabla 3.** Codificación y procedencia de las muestras analizadas

Codificación	Tipo de muestra	Número de muestras (n)	Población	Comunidad Autónoma
M50 a 53	Grano	4	Sariñena	Aragón
M54 a 57	Forraje	4	Sariñena	
M99 a 102	Grano	4	Fuentes de Ebro	
M116 a 117	Grano	2	Altorricón	
M180 a 184	Grano	5	Lupiñén	
M249 a 259	Grano	11	Jaca	Cataluña
MC1 a C4	Grano	4	Lérida	

La cebada fue proporcionada por los agricultores justo después de la cosecha, tomando muestras de 1 Kg en distintos puntos del remolque. Estas muestras se limpiaron para eliminar las impurezas procedentes del campo e inmediatamente después se midió el contenido en humedad de los granos en las cooperativas.

Posteriormente se empaquetaron en bolsas de poliestireno y se enviaron a la Universidad de Zaragoza con un documento en el que se registraba toda la información relativa a las muestras (contenido en humedad, localización del muestreo, prácticas agrícolas empleadas...). Asimismo, tras la recepción, se almacenaron en congelación hasta el momento de su análisis.

Para el acondicionamiento de las muestras de forraje de cebada previo a su análisis se utilizó una estufa de desecación en la que se fijó la temperatura a 105°C durante 5 horas para expresar los resultados sobre la materia seca.

## 6.2 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO

El método analítico consistió en una etapa de extracción de las toxinas de la matriz mediante disolventes orgánicos y, posteriormente, se procedió a la purificación del extracto por columnas de inmunoafinidad (IAC). Una vez obtenido el extracto purificado, la determinación y confirmación de deoxinivalenol se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector de red de diodos (DAD).

Para las etapas de extracción de deoxinivalenol y purificación de las muestras fue necesario utilizar como disolvente agua desionizada calidad milli-Q (Millipore) así como gas Nitrógeno C55 (Carburos Metálicos) para la concentración del eluato. Una vez se obtuvo el extracto concentrado, las micotoxinas se reconstituyeron en la misma mezcla que la fase móvil: agua milli-Q, acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (LabScan Analytical Sciences) y metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) de grado HPLC (LabScan Analytical Sciences) en la proporción (90/5/5) para finalmente inyectarse en el sistema HPLC.

El patrón comercial de deoxinivalenol (solución madre) con una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  de deoxinivalenol en acetonitrilo (Sigma-Aldrich) se almacenó a -20°C en un congelador (Templow).

La calibración de las soluciones patrón se realizó siguiendo los procedimientos descrito por la norma UNE-EN 15891:2011. Para la elaboración de la recta de calibrado se partió de la solución madre de 100  $\mu\text{g/mL}$  en acetonitrilo. A partir de esta disolución, se prepararon el resto de soluciones patrón de calibración en la fase móvil de elección (agua/metanol/acetonitrilo) (90/5/5) a las concentraciones que se indican: 0,1; 0,5; 1; 2; 5  $\mu\text{g/mL}$ . En este caso se optó por inyectar dos patrones de calibración superiores a los indicados por la norma ya que algunas muestras estaban contaminadas con una alta concentración de DON.

### 6.3 EQUIPOS Y MATERIAL FUNGIBLE

Debido a la distribución heterogénea de las micotoxinas, cada una de las muestras individuales que llegaron al laboratorio se mezcló y se trituró con un molino K-6 Platino (Ascaso Factory) hasta una correcta homogeneización.

En la etapa de extracción de las micotoxinas de la matriz se necesitó una balanza analítica monoplato (Sartorius CP 224 S) con 0,0001 g de precisión para pesar 5 g muestra que se añadieron a un tubo de centrifuga de 50 mL.

Tras la adición de la disolución de extracción a la muestras se agitó la mezcla con el rotatubos (TK3S TechnoKartell) y se filtró el extracto con papel de filtro Whatman nº 4 de 125 mm de diámetro; en el caso de que el extracto no quedara transparente sería necesario volver a filtrarlo con un papel de filtro de microfibras de vidrio (Chmlab group) con el fin de obtener un extracto sin turbidez.

Para evaporar las muestras a sequedad por corriente de N<sub>2</sub> se usó un concentrador de muestras con una placa calefactora para evaporar muestras por corriente de N<sub>2</sub> (BioCote Coventry, Reino Unido). De esta manera se pudo concentrar las muestras y disolverlas en la misma fase móvil que se usa en el HPLC.

En paralelo, para la filtración y degasificación de la fase móvil es necesario un sistema de filtración a vacío compuesto por la bomba de vacío XX5522050 Millipore (de 0 a 100 kPa), un matraz Erlenmeyer de 1 L, porta-filtros con pinza y matraz Kitasato de 1 L (Áfora).

La determinación de los niveles de DON se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en un modelo Agilent HP 1100 series (Agilent Technologies) equipado con un módulo de bomba o sistema de bombeo binario para la fase móvil con un inyector manual con un loop de un volumen de inyección de 100 µL, y detector ultravioleta de red de diodos (DAD). Como fase estacionaria se usó una columna cromatográfica de fase reversa (ACE 5 octadecil RP C18) de 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro y 5 µm de tamaño de partícula. Para la determinación y cuantificación de las micotoxinas se contó con una unidad de control del equipo y tratamiento de datos con el software Chemstation 3D.

#### 6.4 TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEBADA Y FORRAJE DE CEBADA

Las muestras de cebada se analizaron a partir de un método optimizado y validado en el laboratorio basado la norma UNE-EN 15891:2011: “Productos alimenticios. Determinación de deoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método HPLC con purificación de columna de inmunoafinidad y detección por UV” así como también el protocolo estandarizado por el fabricante de columnas de inmunoafinidad (VICAM, 2013).

En primer lugar, para la etapa de extracción, se pesaron 5 g de muestra de cebada en un tubo de centrifuga de 50 mL. Posteriormente se añadieron 20 mL de Agua milli-Q y se homogeneizaron en el rotatubos (TK3S TechnoKartell) durante 3 minutos (Véase Figura 2) Posteriormente se filtró la mezcla con papel de filtro Whatman N° 4.



**Figura 2** De izquierda a derecha: 5 g de muestra, 5 g de muestra+20 ml de agua mili-Q, muestra homogeneizada

Si el extracto cuando se filtra está muy turbio, se modifica el protocolo y se añade el paso de volver a filtrar con filtro de microfibras de vidrio para conseguir un extracto sin turbidez.

En el caso de las muestras de forraje de cebada se modificó la cantidad de disolución de extracción. En lugar de diluir los 5 g de muestra en 20 mL de Agua milli-Q, se diluyeron en 100 mL, ya que el forraje absorbía los 20 mL indicados en el protocolo y no se podía disponer de al menos 5 mL de extracto filtrado. La cantidad mínima

requerida de extracto para llevar a cabo el análisis debía de ser de 1 mL (equivalentes a 0,25 g de muestra que indica el protocolo que deben pasarse por la columna de inmunoafinidad).

En la etapa de purificación; el primer paso consistió en acondicionar la columna de inmunoafinidad (IAC DONTest WB<sup>TM</sup>) con 1 mL de agua milli-Q pasando previamente el buffer que contiene la columna. Tras acondicionar la columna, se pasó 1 mL del extracto filtrado (equivalente a 0,25 g de muestra) a una velocidad de flujo de 1 gota/segundo. Posteriormente se lavó la columna con 5 mL de agua milli-Q para eliminar interferencias que pudieran afectar a la cuantificación de las micotoxinas. Finalmente, para eluir las micotoxinas unidas a los anticuerpos de la columna, el DON se eluyó con 2 mL de MeOH que se añadieron a la columna a una velocidad de flujo de 1 gota/segundo. El eluato se evaporó hasta sequedad y se reconstituyó en 500 µL de fase móvil para finalmente inyectarse 100 µL en el HPLC acoplado a un detector de diodos.

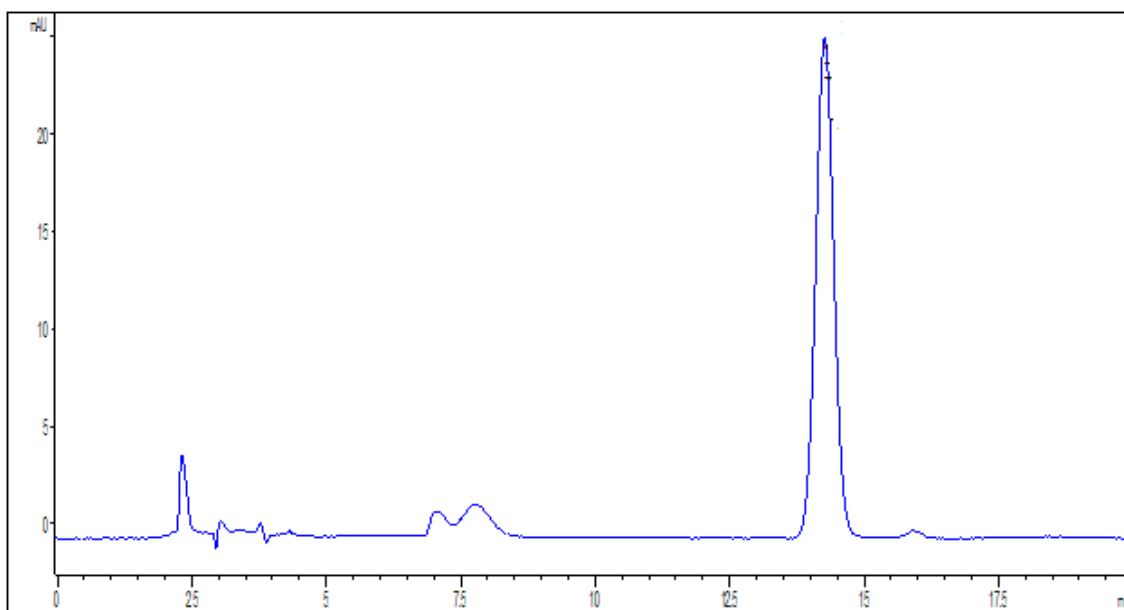
El tiempo de análisis cromatográfico para la detección y cuantificación del DON se optimizó en 17 minutos y el detector DAD se fijó a una longitud de onda de 220 nm.

Con esta técnica analítica se obtuvo un porcentaje de recuperación del 96,2%, desviación estándar relativa (RSD) del 4,5%, límite de detección de 33 µg/kg y límite de cuantificación de 100 µg/kg.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

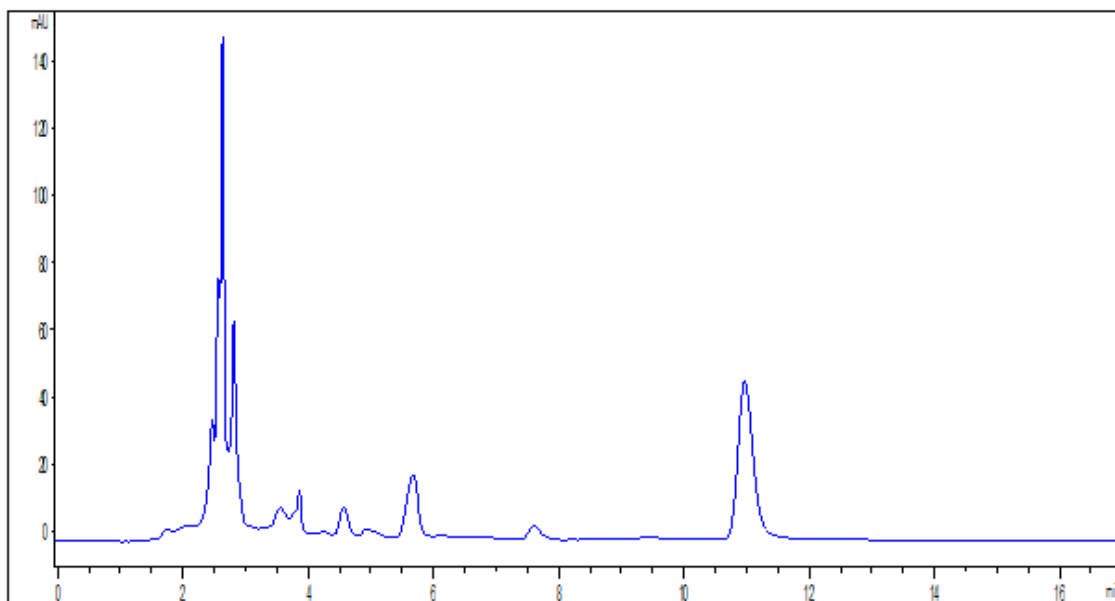
En este apartado se presentan detalladamente los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita en material y métodos. Tanto las muestras de grano de cebada como las de forraje de cebada se sometieron al proceso completo de extracción, purificación y determinación cromatográfica optimizado y validado. De esta manera se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las muestras, identificándose los picos correspondientes al deoxinivalenol tras la comparación del tiempo retención del analito presente en la muestra con los tiempos de retención correspondientes a los patrones de las curvas de calibración inyectadas diariamente.

El primer ensayo consistió en inyectar un patrón de deoxinivalenol de 5  $\mu\text{g/mL}$  y una muestra de cebada. Una vez inyectados, se observó que ninguna interferencia procedente de los disolventes, de los materiales que estaban en contacto con la muestra y de la matriz coincidía con el tiempo de retención del deoxinivalenol (14 minutos). (Véanse Figuras 3 y 4)



**Figura 3.** Cromatograma de un patrón de 5  $\mu\text{g/mL}$  de DON que eluye a un tiempo de retención de 14 minutos.

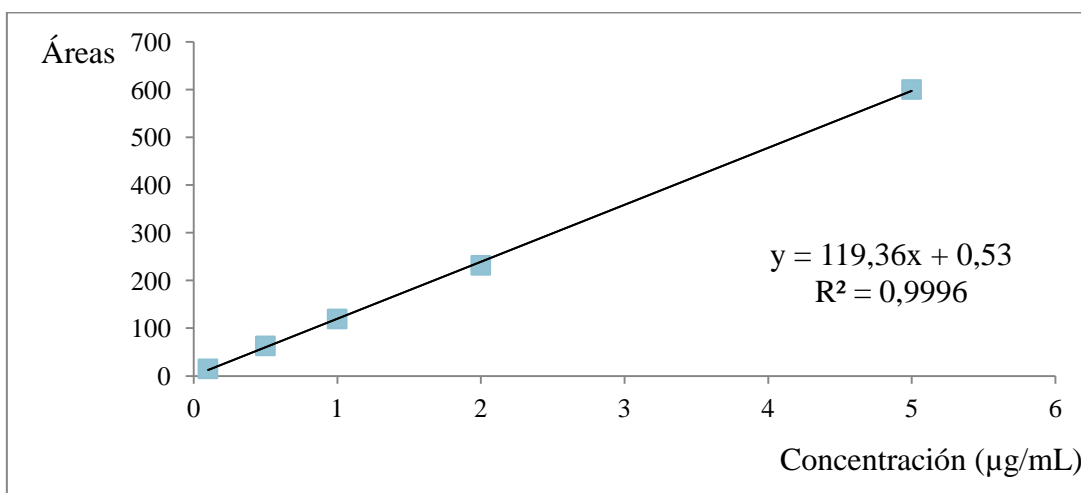




**Figura 4.** Cromatograma de una muestra de cebada negativa a DON.

Al no existir efecto matriz en el análisis de la cebada, la calibración se realizó por el método del patrón externo. Para la construcción de las rectas de calibrado se utilizaron patrones analíticos a distintas concentraciones de deoxinivalenol en un intervalo de 0,1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Las rectas de calibración se elaboraron diariamente con cinco patrones: 0,1; 0,5; 1; 2; y 5  $\mu\text{g/mL}$ , para poder calcular, por interpolación, la concentración de deoxinivalenol en las muestras problema. La linealidad se verificó obteniéndose una  $R^2 > 0,999$  en cada una de las rectas elaboradas diariamente. A continuación se muestra una de las rectas de calibrado elaboradas mediante el método del patrón externo (Véase Figura 5):



**Figura 5.** Curva patrón para el cálculo de la concentración de DON en las muestras.

Una vez estandarizada la metodología para determinar deoxinivalenol en cebada se procedió al análisis del resto de muestras recibidas.

#### 7.1 TASAS DE DEOXINIVALENOL EN GRANOS DE CEBADA Y FORRAJE DE CEBADA

Las tasas de DON (Véase Tabla 4) que se detectaron en las muestras analizadas fueron las siguientes:

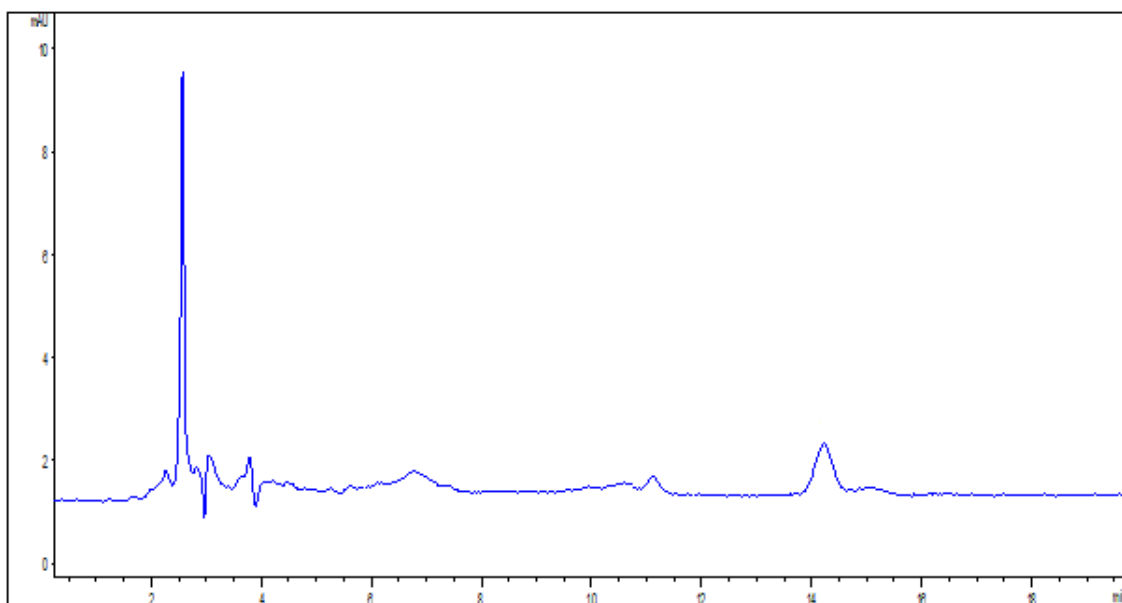
**Tabla 4.** Tasas de DON en las muestras analizadas.

Muestra	n	Positivos	Media (µg/kg)	Intervalo (µg/kg)
Granos de cebada	30	26,7%	230	110 -500
Forraje de cebada	4	100%	620	100 - 1710

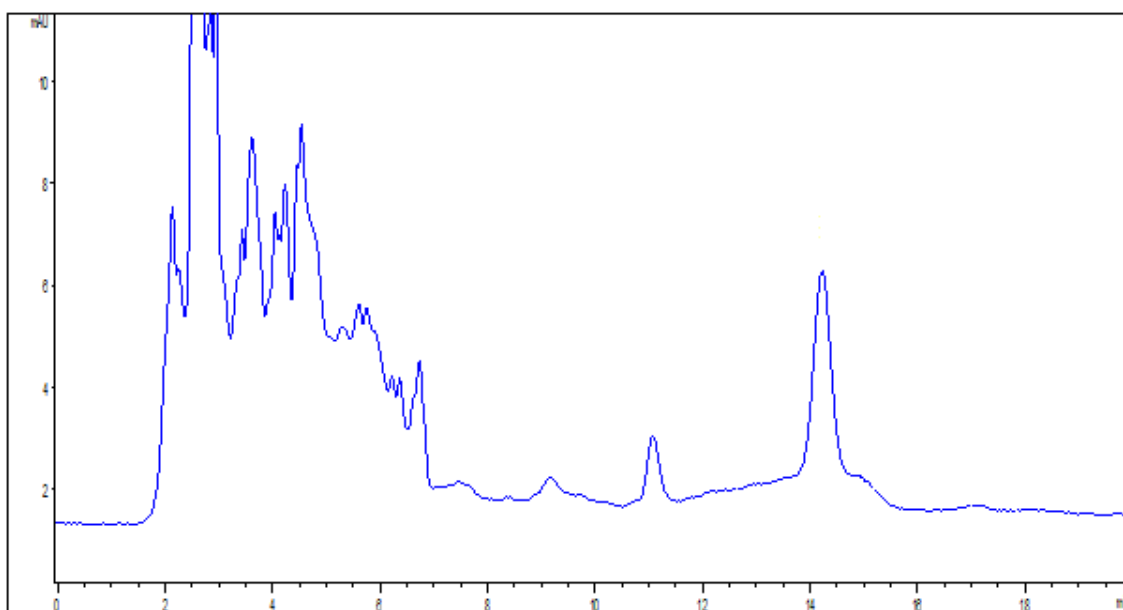
Los resultados obtenidos indican una contaminación media de deoxinivalenol en granos de cebada de 230 µg/kg, con unas tasas de contaminación comprendidas entre 110 y 500 µg/kg. El porcentaje de positividad en este tipo de muestras fue de un 26,7% (muestras por encima del límite de cuantificación de la técnica establecido en 100 µg/kg). Sin embargo, ninguna de ellas sobrepasó los límites máximos establecidos por la legislación para el DON en cebada destinada a alimentación humana (Reglamento (CE) 1881/2006) y como materia prima con destino a alimentación animal (Recomendación 2006/576/CE).

En el caso de las muestras de forraje de cebada, se puede apreciar que el 100% de las muestras analizadas estaban contaminadas con DON y que presentaban tasas entre 100 y 1710 µg/kg pero no superaban en ningún caso los criterios establecidos por la legislación. Es destacable la correlación observada entre las tasas de DON en los granos de cebada y en las muestras correspondientes de forraje (muestras emparejadas de Sariñena). Esto explicaría la alta prevalencia y persistencia de las esporas de *Fusarium* en los residuos de las cosechas de cebada y su influencia en la infección y contaminación con DON en cultivos susceptibles en rotación con este cereal.

En las siguientes figuras (Véanse Figuras 6 y 7) se puede observar una muestra de grano y otra de forraje de cebada contaminadas con DON:



**Figura 6.** Cromatograma correspondiente a una muestra de grano de cebada, con un tiempo de retención de 14,219 minutos, y una concentración de DON de 500  $\mu\text{g/kg}$ .



**Figura 7.** Cromatograma correspondiente a una muestra de forraje de cebada, con un tiempo de retención de 14,226 minutos, y una concentración de DON de 1710  $\mu\text{g/kg}$ .

Los mayores niveles de contaminación se presentaron en una muestra de Sariñena cuyo grano de cebada presentaba una contaminación de 500  $\mu\text{g/kg}$  de DON y el forraje correspondiente estaba contaminado con tasas de DON de 1710  $\mu\text{g/kg}$ .

En el estudio de Ibáñez-Vea et al. (2012) sobre 123 muestras de cebada procedentes de Navarra, la prevalencia de DON fue del 95%, pero el límite de cuantificación era de 20  $\mu\text{g/kg}$ , lo que explica la mayor positividad. Bolechová et al. (2015) analizaron 52

muestras de cebada de la cosecha del 2012 en la República Checa y determinaron concentraciones de DON comprendidas entre 69,9 µg/kg y 602,3 µg/kg. Los resultados que obtuvieron así como el rango de concentraciones en el que se encontraban las muestras fueron muy semejantes a los obtenidos en nuestro laboratorio.

En un estudio de las cosechas de cebada durante los años 2002 a 2005 en el Reino Unido (Edwards, 2009), se detectó la presencia de DON en el 57% de las 446 muestras de cebada analizadas, sólo una ellas (0,2% del total) superó el límite legal para el DON en cebada sin procesar fijado en 1250 µg/kg por la Unión Europea. A pesar de que el número de muestras que se analizaron fue inferior al de estos países, el porcentaje de muestras positivas y la ausencia de muestras que superen el límite máximo establecido por la legislación fueron similares a los publicados por los estudios mencionados.

## 7.2 EFECTO DEL CLIMA Y LAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS EN LA CONTAMINACIÓN POR DON

El periodo crítico comprendido entre la floración y la cosecha de la cebada, es el más susceptible a la infección por mohos y producción de micotoxinas, por ello un elevado grado de humedad o las temperaturas altas entre la floración y la cosecha favorecen la presencia de micotoxinas.

Inmediatamente después de la cosecha, en las cooperativas que nos suministraban las muestras se determinó el contenido en humedad de los granos de cebada y ninguna de las muestras superaba el 15%. Este valor es el considerado por muchos autores como seguro para evitar el crecimiento del mohos micotoxigénicos (Wicklow, 1995).

El clima tiene un efecto directo sobre la contaminación por micotoxinas en la cebada. El 100% de las muestras analizadas de Aragón procedían de una zona clasificada como cálida-árida (Sariñena) en la que durante la época de floración del grano se registraron temperaturas altas (>25°C). Sin embargo, el resto de muestras, pertenecían a zonas templadas y frías como Fuentes de Ebro, Altorricón, Lupiñén, Jaca y Lérida.

Las precipitaciones intensas, el exceso de riego y el abuso del sistema de aspersión durante periodos críticos como el espigado y la floración tienen un impacto importante en la diseminación y el desarrollo de mohos y contaminación por micotoxinas en los cereales.

En el presente trabajo se confirmó que el 100% de las muestras que se analizaron en Aragón como positivas procedían de cultivos de regadío de Sariñena con sistema de riego por aspersión. Sin embargo, el régimen hídrico de las otras zonas (regadío a manta y secano) presentó una menor influencia sobre la contaminación con DON. Por ello se recomienda en base a este resultado que en la medida de lo posible se gestione adecuadamente el riego durante la floración, es decir, que todo el cultivo reciba la misma cantidad de agua y de una manera homogénea. Así como no abusar del sistema de aspersión que favorece la dispersión de las esporas. En este sentido sería recomendable controlar la densidad de siembra evitando que sea alta.

Del mismo modo, se ha comprobado que el trigo, la cebada y el maíz son especialmente sensibles a las especies fúngicas de *Fusarium* y *Aspergillus*, por lo tanto, no se deberían establecer rotaciones entre ellos (Pirgolev et al., 2003). Las muestras contaminadas con DON que se han analizado correspondían a cultivos en los que previamente se había cultivado maíz con lo que se comprobó que puede ser un factor de riesgo establecer una rotación de maíz y cebada porque ambos cereales son hospedadores de *Fusarium*. También se ha comprobado que los residuos de forraje de cebada recogidos tras la cosecha presentaban tasas elevadas de contaminación con DON (1710 µg/kg) con lo que se confirma que los residuos que no se recogen y quedan extendidos sobre la superficie del suelo desempeñan un papel importante en la infección por *Fusarium* de cereales (Maiorano et al. 2008).

## 8 CONCLUSIONES

- El 26,7% de las muestras grano de cebada presentaron contaminación por DON con una tasa media de 230 µg/kg, mientras que la prevalencia en las muestras de forraje de cebada fue de 100% con una concentración media de 620 µg/kg.
- Se observó una correlación entre las tasas de DON en los granos de cebada y en las muestras correspondientes de forraje. Esto explicaría la influencia en la contaminación por DON de cultivos susceptibles que estén en rotación con cebada.
- Las tasas de contaminación más altas correspondían a muestras de granos de cebada en los que los residuos de la cosecha anterior se habían dejado en superficie.
- El 100% de las muestras positivas de Aragón procedía de una zona cálida-árida en la que durante la época de floración del grano se registraron temperaturas altas (>25°C).
- Las muestras de Aragón contaminadas con DON correspondían a cultivos en los que previamente se había cultivado maíz, conocido hospedador de especies de *Fusarium*, con lo que se comprobó que esta rotación es un factor de riesgo.
- Todas las muestras positivas de Aragón procedían de cultivos de regadío con sistema de riego por aspersión. Este sistema puede favorecer la dispersión de las esporas, sobre todo si la densidad de siembra es alta.
- Dado el bajo número de muestras analizadas, estas conclusiones deberían ser confirmadas con estudios posteriores.

## 9 CONCLUSIONS

- 26.7% of the barley grain samples were contaminated with DON with an average level of 230 µg/kg, while the prevalence in samples of fodder barley was 100% with an average concentration of 620 µg/kg.
- A correlation between rates of DON in grains of barley and corresponding forage samples was observed. This would explain the influence on DON contamination in susceptible crops which are rotated with barley.
- The highest rates of contamination corresponded to barley grain samples where the previous crop residues were left on the surface.

- 100% of the positive samples came from warm-arid areas of Aragon, that showed high temperatures ( $> 25^{\circ}\text{C}$ ) during the flowering season.
- Aragon samples contaminated with DON corresponded to fields where the previous crop was corn, a known *Fusarium* host species, which was found to be a risk factor.
- All positive samples from Aragón came from crops irrigated with sprinkler system. This system can favor the dispersal of spores, especially if planting density is high.
- Given the low number of samples analyzed, these findings should be confirmed with further studies.

## 10 APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

Conocimiento de bases de datos y búsqueda de artículos científicos, tanto en español como en inglés, siendo capaz de seleccionar y sintetizar la información más relevante de todos los artículos encontrados.

Mejora en la redacción y estructura de informes científicos, así como adquisición de competencias en Word y Excel.

Capacidad de trabajar de manera autónoma en el laboratorio, ya que durante los cuatro años del Grado estaba acostumbrada a trabajar en grupo en todas las prácticas realizadas en cada una de las asignaturas.

## 11 EVALUACIÓN DE LA ASIGNATURA Y SUGERENCIAS DE MEJORA

Es una asignatura bien planteada dentro de la programación docente del Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ya que es importante para nuestro futuro saber gestionar los resultados obtenidos en un estudio y plasmarlos en un informe científico, así como saber utilizar un lenguaje adecuado acorde con el tema estudiado.

Pero por el contrario, creo que es una asignatura que está poco valorada, ya que conlleva un trabajo que solo está reconocido con 6 ECTS. Por este motivo, y dada la importancia y tiempo que hay que invertir en la realización de este trabajo propondría un aumento de créditos ECTS para que se correspondan con todo el tiempo y trabajo invertidos en él.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, D. (1998). Mycotoxin formation and environmental factors. En: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. K.K.Sinha y D. Bhatnagar (EDS). Marcel Dekker, Inc., New York, pp.255-277.
- Bolechová, M. Benésová, K. Beláková, S. Cáslavský, J. Pospíchalová, M. Mikulíková. R. (2015) Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. Food Control 47 108 - 113.
- Bottalico, A., y Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology, 108, 611–624.
- Comisión Europea (2006a). Reglamento 1881/2006/CE de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Official Journal of the European Union L364:5-24.
- Comisión Europea (2006b). Recomendación 576/2006/CE. Contenido máximo de micotoxinas en piensos y otros productos para alimentación animal
- Cunha, S.C. y Fernandes, J.O. (2012) Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for determination of deoxynivalenol and its metabolites in human urine. Food and Chemical Toxicology 50 1019-1026.
- Edwards, S.G. (2009). *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. Food Additives and Contaminants, 26 (08), 1185-1190
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S., y Collin, J. (2001). Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). Can. J. Plant Pathol. 23, 318-322.
- Gilbert, J. y Tekauz, A. (2000). Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. Can J. Plant Pathol. 22:1-8.
- Hooker, D.C., Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilincic, L. (2002). Using weather variables pre- and postheading to predict deoxynivalenol in winter wheat. Plant Disease 86, 611-619.
- IARC (1993) Volumen 56. Some naturally occurring substances: food ítems and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- Ibáñez-Vea, Lizarraga, E., González-Peñas, E., López de Cerain, A. (2012). Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. Food Control 25, 81-88.
- JECFA (2011). Evaluation of certain contaminants in food: Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 959.
- Jurado, M. (2006). Análisis y diagnóstico de especies de *Fusarium* productoras de toxinas, y su presencia en cereales españoles. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Khonga, E. B. y Sutton, J. C. (1988). Inoculum Production and Survival of *Gibberella Zeae* in Maize and Wheat Residues Canadian Journal of Plant Pathology 178 10(3):232-239.



- Klinglmayr, C. Noebauer, K. Razzazi-Fazeli, E. y Cichna-Markl, M. (2010) Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878 187-193.
- Klotzel, M. Schmidt, S. Lauber, U. Thielert, G. y Humpf, H.U. (2005) Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia* 62 41-48.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., y Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1595–1612.
- Larsen, J.C. Hunt, J. Perrin, I. y Ruckebauer, P. (2004) Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters* 153 1-22.
- Lermo, A. Fabiano, S. Hernandez, S. Galve, R. Marco, M.P. Alegret, S. y Pividori, M.I. (2009) Immunoassay for folic acid detection in vitamin-fortified milk based on electrochemical magneto sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 24 2057-2063.
- MacDonald, S.J. Chan, D. Brereton, P. Damant, A. y Wood, R. (2005) Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Aoac International* 88 1197-1204.
- Maiorano A, Blandino M, Reyneri A, y Vanara F (2008). Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Protect* 27:182-188.
- Meneely, J.P., Ricci, F. van Egmond H.P., y Elliott, C.T. (2011) Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30 192-203.
- Muscarella, Iammarino, M. Nardiello, D. Palermo, C. y Centonze, D. (2012) Determination of deoxynivalenol and nivalenol by liquid chromatography and fluorimetric detection with on-line chemical post-column derivatization. *Talanta* 97 145-149.
- Norma UNE-EN 15891: 2011. Productos alimenticios. Determinación de desoxinivalenol en cereales, productos a base de cereales y en alimentos a base de cereales para bebés y niños. Método HPLC con purificación de columna de inmunoafinidad y detección por UV.
- Pereyra, S.A., y Dill-Macky, R (2008) Colonization and inoculum production of *Gibberella zeae* in components of wheat residue. *Cereal Res Commun* 33; 755-762.
- Pereyra, S. A., Dill-Macky, R. y Sims, A. L. (2004). Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease* 88(7):724-730;
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., y Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 731–742.
- Ramos, A.J. (2011) Micotoxinas y micotoxicosis. AMV Ediciones

- Ran, R. Wang, C. Han, Z. Wu, A. Zhang, D. y Shi, J. (2013) Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: Current status of analytical methods. *Food Control* 34 138-148.
- Rotter, B.A. Prelusky, D.B. y Pestka, J.J. (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 1-34.
- Schollenberger, M., Jara, H.T., Suchy, S., Drochner, W. y Muller, H-M. (2002) Fusarium toxins in wheat collected in an area in southwest Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 72:85-89.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Dexter, J.E., Brennan, P.W. y Trenholm, H.L. (1984) Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Addit. Contam.* 1(4): 313-323.
- Speijers, G. J. A., y Speijers, M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 91-98.
- Schwarz, P.B., Horsley, R. D., Steffenson, B. J. y Salas, B. (2006). Quality Risks Associated with the Utilization of Fusarium Head Blight Infected Malting Barley. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64(1):1-7
- Tacke, B.K. y Casper, H.H. (1996) Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Aoac International* 79 472-475.
- Trucksess, M.W. Page, S.W. Wood, G.E. y Cho, T.H. (1998) Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran by solid-phase extraction liquid chromatography: Interlaboratory study. *Journal of Aoac International* 81 880-886.
- VICAM. (2013). Deoxynivalenol (DON) Testing Solutions. DONTest HPLC [Internet]. [cited 2013 May]. Available from: <<http://vicam.com/don-test-kits>>.
- Wicklow, D.T., (1995). The mycology of stored grain: an ecological perspective. In: Jayas, D.S., White, N.D.G., Muir, W.E. (Eds.), *Stored-Grain Ecosystems*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 197-249.
- Xu, X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of Fusarium ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 683-689.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.